Versuche und Gedanken über die konservierende Wirkung der Benzoesäure

---

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt der

Hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg

von

Dirk Held
Arzt aus Amsterdam

München 1915
Druck von R. Oldenbourg

Diss. Würzburg 1915.

63643.

Versuche und Gedanken über die konservierende Wirkung der Benzoesäure

---

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt der

Hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg

von

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Dirk Held
Arzt aus Amsterdam

München 1915
Druck von R. Oldenbourg

Referent: Professor Dr. K. B. Lehmann.

I. Vorbemerkung.

Es herrscht wohl allgemeine Übereinstimmung im Kreise der Hygieniker darüber, daß man für die Konservierung von Nahrungsmitteln möglichst mit physikalischen Methoden (Hitze, Kälte, Austrocknen) auskommen soll. Die Mehrzahl der Hygieniker ist auch der Meinung, daß von den chemischen Konservierungsmitteln die altbewährten (Kochsalz, Zucker, Rauch, Säure) vor den sog. künstlichen chemischen Konservierungsmitteln einen erheblichen Vorzug besitzen. Nun ist aber allseitig zugegeben, daß es einzelne Gegenstände gibt, die man durch Hitze nicht konservieren kann, weil sie dadurch in unerwünschter Weise verändert werden, z. B. Kaviar, Zitronensaft, mindestens dann verändert werden, sowie die Erhitzung bis zur Sterilisation ausgedehnt wird, z. B. Krabben. Mit Kälte läßt sich für den ländlichen Kleinhandel auch nichts erreichen, Trocknen ist in vielen Fällen vollständig ausgeschlossen, und die Anwendung der alten Konservierungsmittel scheitert daran, daß durch ihre Anwendung der Geschmack in unerwünschter Weise beeinflußt wird. Wir haben also hier einige Beispiele von Nahrungsmitteln kennen gelernt, bei denen die chemischen Konservierungsmittel eine gewisse Berechtigung haben. Ähnlich dürfte die Sache bei der Margarine liegen, deren sichere Haltbarkeit unter gewissen Bedingungen nur verbürgt zu

sein scheint, wenn eine geringe Menge eines Konservierungsmittels zugesetzt ist. Besonders die Verhältnisse der tropischen Länder machen Konservierungsmittel schwer entbehrlich.

Es haben deswegen Studien über die Wirkung der chemischen Konservierungsmittel immer wieder ein allgemeines Interesse. Der Kreis der praktisch in Frage kommenden Konservierungsmittel für menschliche Nahrungsmittel ist durch Studien der letzten 15 Jahre ziemlich eingeengt; Flußsäure, Borsäure, für das Fleisch auch schweflige Säure sind fast allgemein abgelehnt. Auch die früher viel empfohlene Salizylsäure tritt zurück, seitdem die Benzoesäure als ein Mittel gefunden ist, gegen das noch nicht ein toxikologischer Einwand auf Versuche gestützt erhoben worden ist, von dem vielmehr feststeht, daß sowohl einmalige große Dosen als wie lange fortgesetzte kleine vom Menschen ganz auffallend gut vertragen werden. Der Grund liegt offenbar nicht nur darin, daß einzelne menschliche Nahrungsmittel, z. B. Preiselbeeren, Benzoesäure immer präformiert enthalten, sondern daß die Benzoesäure höchst wahrscheinlich als Zwischenprodukt des Stoffwechsels regelmäßig auftritt, so daß der Körper also auf diesen Stoff eingestellt ist. Es würde mich zu weit führen, über die Frage der Gesundheitsunschädlichkeit der Benzoesäure und ihrer konservierenden Wirkung usf. hier weitere Mitteilungen zu machen. Ich verweise auf die kritischen Referate, die Herr Prof. K. B. Lehmann in der Chemikerzeitung 1911, Nr. 140, S. 1297, gegeben hat und worin sich das ganze Material unparteiisch gesichtet findet.

Dagegen kann ich nicht unterlassen, hier anzugeben, daß es mir nicht gelungen ist, in der hygienischen Literatur in der Zeit von 1901 bis heute einen einzigen Fall auch nur von behaupteter Schädigung durch ein chemisches Konservierungsmittel zu finden. Rudolf Abel hat 1901 in der Hygienischen Rundschau im ganzen vier hierhergehörige, im übrigen durchaus nicht ohne weiteres beweisende Fälle von Vergiftungen durch Borax, Borsäure und schweflige Säure zusammengetragen — ich habe keine weiteren finden können in den folgenden 13 Bänden der Hygienischen Rundschau, insbesondere keinen von Benzoesäure.

II. Was für Organismen bedingen die Verderbnis der Büchsenkonserven? — Gegen welche Organismen soll also die Benzoesäure wirken?

Alle in Frage kommenden Organismen sind sporenhaltig, also Bazillen in engerem Sinne[1]). Die Sporen sind zum Teil außerordentlich widerstandsfähig gegen Wärme. Aus den Untersuchungen von Aderhold und den ausführlichen von v. Wahl geht hervor, daß die Bazillen aus verdorbenen Konserven unter sich ziemlich verschieden sind, daß sie bald mehr dem subtilis, dem asterosporus, megatherium, mesentericus gleichen, daß aber auch Formen vorkommen, die die Autoren mit schon beschriebenen Arten nicht zu identifizieren wagen und denen sie neue Namen gegeben haben. So hat v. Wahl einen Bac. aerobius, asparagi, pisi, destruens, phaseoli, malacofaciens, tuberis beschrieben. Interessant ist, was v. Wahl fand, daß die isolierten Arten häufig keine besonders resistenten Sporen besaßen, und daß sie auch, wenn sie aus aufgetriebenen gashaltigen Büchsen isoliert waren, nicht immer eine deutliche Gasbildung besaßen, Zeichen dafür, daß durch das längere Wachstum in den Konserven die Eigenschaften der Organismen verändert waren. Es ist v. Wahl gelungen, durch Züchten der isolierten Organismen auf trockener, steriler Erde wieder Sporen von wesentlich höherer Resistenz zu erhalten. Aus dem Gesagten geht schon ohne weiteres hervor, warum gelegentlich die Büchsensterilisierungsmethoden unbefriedigende Resultate haben. Haben die Sporen eine ganz extreme Resistenz, so reicht eben das übliche Sterilisierungsverfahren nicht aus, obwohl man in manchen Fabriken bis zur Temperatur von 118° geht. Glücklicherweise ist die Mehrzahl der untersuchten Arten mehr oder weniger thermophil, so daß ein Auskeimen der durch das Erhitzen immerhin geschädigten Sporen nur bei warmem und unzweckmäßigem Aufbewahren in einem etwas größeren Prozentsatz gelingt und die

1) Merkwürdig ist, daß G. Rudolph (Diss. der phil. Fakult. Zürich, 1907) unter 12 aus verdorbenen vegetabilischen Konserven isolierten Bakterien die meisten sporenfrei fand. Diese Konserven mußten also wenig erhitzt oder nach dem Erhitzen wieder verunreinigt oder die Bakterien in ihrer Sporenbildungsfähigkeit geschädigt sein.

ganz überwiegende Mehrzahl der Büchsen nicht verderben, wenn auch einzelne Sporen am Leben blieben.

Ich brauche nicht auszuführen, daß den Fabriken nicht freisteht, das Erhitzen beliebig lange und beliebig hoch anzuwenden, um eine absolut sichere Sterilisierung hervorzubringen. Schließlich leidet der Geschmack der Nahrungsmittel ganz unverkennbar. So wird gekochte Milch schließlich bitter. Auch die Zersetzung der Vitamine würde nach den heutigen Anschauungen nicht als gleichgültig angesehen werden dürfen.

In meinen Untersuchungen habe ich keine Stämme verwendet, die aus verdorbenen Konserven gezüchtet waren, sind doch die Eigenschaften derselben nach dem oben Gesagten außerordentlich variabel, sondern ich habe mich dreier Stämme bedient, die aus der Sammlung des hygienischen Instituts unter dem Namen mesentericus, subtilis und mycoides seit langem fortgezüchtet wurden, und habe außerdem selbst noch aus Boden, Heu und Kartoffeln drei Stämme frisch isoliert und dieselben in folgendem mit »Bac. aus Boden« resp. »Heu« resp. »Kartoffeln« bezeichnet. Die Organismen aus Boden und Heu bestimmte ich nach Lehmann und Neumann als Bac. mesentericus Flügge, den aus Kartoffeln als Bac. aterrimus Beil — doch muß ich gestehen, daß kleine Differenzen vorhanden waren. Alle Stämme besaßen sehr gute Sporenbildung.

III. Tritt die Hemmung der Sporenkeimung durch Benzoesäure früher ein als die Hemmung der vegetativen Vermehrung der Bazillen?

Es kann keinem Zweifel unterliegen und bedarf keiner besonderen Versuche von mir, daß Sporen gegen Chemikalien, also auch gegen die Benzoesäure außerordentlich resistenter sind als wie Bazillen, so lange sie nicht keimen. Da aber die Konservensporen die einzige in Büchsen in Frage kommende Entwicklungsstufe der Bazillen darstellen und die Sporen nur Zersetzung bedingen können, nachdem sie gekeimt sind, so hat die Frage ein gewisses Interesse, ob vielleicht schon sehr niedere Gehalte an Benzoesäure die Auskeimung der Sporen

verhüten, Gehalte, die noch unter dem liegen, was zur Hemmung des Bakterienwachstums ausreicht. Daß es möglicherweise eine solche Konzentration geben kann, die zwar die Bazillen noch nicht schädigt, die Sporen aber an der Auskeimung hindert, könnte man aus dem merkwürdigen Ergebnisse von Roux vermuten. Roux fand, daß Anthraxsporen in schwach alkalischer Kalbsbouillon, die man vor der Beimpfung während 3—4 Stunden durch die Sonne bescheinen ließ, nicht mehr keimten. Säte man aber Milzbrandbazillen aus, z. B. Milzbrandblut, dann wachsen diese wohl in der Bouillon, sogar reichlich. Die Änderung des Mediums durch die Bestrahlung genügte also, um die Sporenevolution zu verhindern, schädigte die bereits gebildeten Bazillen aber nicht. Es ist also nicht unmöglich, daß wir auch bei Benzoesäuredesinfektion die Sporenkeimung eher gehemmt finden als das Bazillenwachstum. Wäre dies der Fall, dann würde das von großer Wichtigkeit sein für die Nahrungsmittelindustrie.

Beiläufig möchte ich noch eine sehr überraschende Notiz von Arloing erwähnen. Es gelang Arloing, durch eine zweistündige Bestrahlung mit Sonnenlicht im Juli, bei einer Temperatur zwischen 35° und 39°, jeder Entwicklung von frisch ausgesäten Sporen von Bac. anthracis in Hühnerbouillon vorzubeugen (ob sie dabei abgetötet wurden, ist allerdings nicht bestimmt gesagt). Dagegen genügte erst eine Bestrahlung von 27—30 Stunden cet. par., um die Bazillen in voller Entwicklung zu töten.

Zur Prüfung des Verhaltens von Sporen und Bazillen gegen Desinfektionsmittel habe ich in diesen Versuchsreihen ausschließlich Agarnährboden angewendet, nämlich gewöhnliche 2proz. Agarbouillon. Zur Neutralisation mit Soda und Phenolphthalein titrierte ich je 10 ccm, mit dest. Wasser verdünnt, mit $^1/_{10}$ Lauge, um den Umschlag der Färbung genauer zu sehen. Trotz aller Sorgfalt ist aber die Titrierung für **1 l** Agar nicht genauer als wie auf 1,0—1,5 ccm Normalnatronlauge durchzuführen. Ich glaube, durch solche kleine Schwankungen der Alkalinität die kleinen Abweichungen einzelner Resultate in den folgenden Tabellen erklären zu können.

Dem neutralen Nährboden setzte ich wechselnde Mengen Weinsäure und Benzoesäure zu, weil ich die Wirkung der Benzoesäure bei verschiedener Gesamtazidität studieren wollte. Es ist längst bekannt, daß Benzoesäure besser wirkt wie benzoesaures Natron, resp. daß saure Objekte leichter zu konservieren sind wie alkalische. Weinsäure erschien als weitverbreitete Säure besonders geeignet. Ich habe alle Säurewerte in Normalsäure ausgedrückt. Das Molekulargewicht der Benzoesäure ist 122, 1 l 1‰ Benzoesäure ist 1 l $^1/_{122}$ Normalbenzoesäure oder enthält 8,2 ccm Normalsäure. Es sind also 1000 ccm 1‰ Benzoesäure 8,2 ccm jeder anderen Normalsäure, z. B. Normalweinsäure, äquivalent. Ich habe zu 1 l neutralen Agars folgende Säuremengen zugesetzt:

0 ccm Normalweinsäure	20,5 ccm Normalweinsäure
4,1 „ „	24,6 „ „
8,2 „ „	28,7 „ „
12,3 „ „	32,8 „ „
16,4 „ „	

Jedem der auf diese Weise erhaltenen Nährböden fügte ich nun respekt. ¼‰, ½‰, ¾‰, 1‰, 1¼‰, 1½‰, 1¾‰, 2‰, 2¼‰, 2½‰, 2¾‰, 3‰ Benzoesäure zu und bekam so Nährböden, die außer ihrem Weinsäuregehalte noch enthält Normalbenzoesäure in ccm:

2,05 = ¼ ‰ Benzoesäure	14,35 = 1¾ ‰ Benzoesäure
4,1 = ½ „ „	16,40 = 2 „ „
6,15 = ¾ „ „	18,45 = 2¼ „ „
8,20 = 1 „ „	20,50 = 2½ „ „
10,25 = 1¼ „ „	22,55 = 2¾ „ „
12,30 = 1½ „ „	24,60 = 3 „ „

Mit Benzoesäure kann man keine höheren Gehalte herstellen, weil Benzoesäure sich nicht über 3‰, entsprechend einer Azidität von 24,6 ccm Normalsäure pro l, löst. Das Bedenken, daß Benzoesäure bei der Sterilisierung des Agars flüchtig sein könnte, ist nach den Versuchen von Christian unbegründet. Man kann im Dampfe kochenden Wassers nur Spuren von darin gelöster Benzoesäure nachweisen.

Die Weinsäure habe ich als Normalsäure zugesetzt — eine einfache Rechnung ergibt, daß es praktisch gleichgültig ist, ob man zu 1 l Agar 8,2 ccm Weinsäure zusetzt, oder ob man 991,8 ccm auf 1000 auffüllt. Von Weinsäure kann man nicht über 35 ccm Normalsäure pro l zusetzen, ohne daß der Agar weich wird (Hydrolyse des Agars).

Zum Impfen dieser Nährböden verwendete ich einmal bazillenfreie Sporen, d. h. ich impfte aus einer Emulsion, die ich mir herstellte, durch Abstreifung einer Öse von einer sehr alten, reichlich mit Sporen durchsetzten Agarstrichkultur in physiologischer Kochsalzlösung. Durch 5 Minuten langes Erwärmen auf 80° wurden die Sporen der Emulsion von einigen etwa noch anhaftenden lebenden Bazillen befreit. Diese Erwärmung muß mit sehr viel Vorsicht geschehen, über welche ich hier nicht reden werde.

Eine Wiederholung der Versuche, bei denen ich unerhitztes Sporenmaterial in flüssigen Agar impfte, die beimpften Agarkulturen sehr sorgfältig und gleichmäßig 5 Minuten auf 80° erhitzte und dann in Schalen ausgoß, ergab genau die gleichen Resultate wie die erste Versuchsanordnung.

Als sporenfreie Bazillen verwendete ich Abstreifungen von jungen, mikroskopisch sporenfreien, etwa 12 Stunden alten Agarkulturen.

Da ich viele Untersuchungen ausführen wollte, mußte ich auf die nächstliegende Methode, die Auskeimung von Sporen und Bazillen auf verschiedenen Nährböden zu studieren, verzichten, nämlich auf die, diese Auskeimung direkt unter dem Mikroskop zu beobachten. Ich verfuhr vielmehr so, daß ich eine Reihe von verschieden benzoesäurehaltigen Nährböden, die eine Serie mit Sporen, die andere mit Bazillen infizierte und im Brutschrank hielt. Nach viertägiger Beobachtung kontrollierte ich bei schwacher Vergrößerung, ob Kolonienbildung aufgetreten war und bestimmte die Konzentration, bei der sie ausblieb.

Bemerkenswert ist es, daß bei dieser Ausführung die keimenden Sporen immer etwas später Wachstum zeigten als die zu gleicher Zeit auf denselben Nährboden geimpften Bazillen. Ver-

ständlicherweise beansprucht der Prozeß der Sporenkeimung etwas mehr Zeit als die Vermehrung der Bazillen.

Die Beobachtung der mit Bazillen angelegten Platte gibt ein ganz eindeutiges Resultat: Von einer gewissen Konzentration an blieb eine Vermehrung der Bazillen aus. Die Resultate an den mit Sporen beschickten Platten waren dagegen theoretisch zweideutig. Wenn keine Kolonienentwicklung stattgefunden hatte, so konnte dies bedeuten, die Sporen waren nicht ausgekeimt, oder sie waren zwar ausgekeimt, die jungen Bazillen hatten sich aber nicht vermehrt.

Diese beiden Fälle, theoretisch verschieden, kommen praktisch für die Konservenindustrie auf das gleiche heraus. Von einer gewissen Konzentration an können Sporen nicht mehr zu einer Zersetzung des Nährbodens führen, ob sie dabei auskeimen oder nicht, ist ohne praktische Bedeutung.

Ich werde also stets im folgenden von „Hemmung der Sporenkeimung" sprechen, ohne damit mehr sagen zu wollen, als daß aus den Sporen keine Kolonien hervorgegangen sind.

Beim Schreiben der Arbeit wurde mir klar, daß es leicht gewesen wäre, auch noch zu untersuchen, ob die Auskeimung gehemmt oder die ausgekeimten Bazillen im Wachstum gehemmt sind. Man hätte bloß eine solche Platte eine kurze Zeit auf 80° zu erhitzen brauchen, um ausgekeimte Bazillen zu töten, während die Sporen hätten überleben müssen. Wenn man dann von einer solchen Platte kleine Mengen in einen nicht mit Benzoesäure versetzten Nährboden gebracht hätte, hätte man nur im Falle des Nichtauskeimens der Sporen Kolonien erhalten. Es war leider zu spät, um solche Versuche auszuführen.

Anderseits hätte ich natürlich auch einige direkte Beobachtungen im hängenden Tropfen machen können, ob die Sporen auskeimen oder nicht. Persönlich halte ich es nicht für wahrscheinlich, daß die Sporen auf einem Nährboden auskeimen, auf dem sich die Bazillen nachher nicht mehr vermehren können. H. Buchner hat uns nämlich gezeigt, daß Sporenbildung bei den dazu befähigten Arten dann eintritt, wenn der Nährboden erschöpft zu werden beginnt. Weiter wissen wir, daß Sporen in

der Regel nicht in diesem erschöpften resp. durch Stoffwechselprodukte nachteilig veränderten (vergifteten) Nährboden, auf welchem sie sich gebildet haben, zur Auskeimung kommen.

Ich teile nun in tabellarischer Form alle meine Versuche abgekürzt mit (siehe Tafel I und II am Schluß).

Ba bedeutet Bazillen.
Sp bedeutet Sporen.
+ bedeutet die Bazillen sind gewachsen resp. die Sporen sind gekeimt.
— bedeutet die Bazillen sind nicht gewachsen resp. die Sporen sind nicht gekeimt.

Zusammenfassung der Resultate der Tafeln I und II.

1. Der zur Hemmung benötigte Gehalt an Benzoesäure ist für alle sechs untersuchten Bazillenstämme der gleiche, wobei ich von einigen leichten Unterschieden bis 2,05 ccm pro l absehe, was sich durch kleine Ungleichmäßigkeiten bei der Agarbereitung erklären kann. Es machte keinen Unterschied, ob ich frisch gezüchtete oder lang im Laboratorium kultivierte Stämme verwendete.

2. Bazillen und Sporen werden immer bei den gleichen Konzentrationen in der Entwicklung gehemmt. Es besteht also keine besondere Empfindlichkeit der Sporen gegenüber den Bazillen gegen Benzoesäure, und es geht nicht an, etwa durch Zusatz sehr kleiner Benzoesäuremengen zu Konserven die Keimung der Sporen in spezifischer Weise verhindern zu wollen.

3. Diese störende Dose beträgt für neutralen Agar 3‰ = 24,6 ccm Normalbenzoesäure pro l. Das ist eine ziemlich große Menge, besonders, wenn man bedenkt, daß 3‰ Benzoesäure sich in Wasser schon sehr schwer löst, so daß man sagen muß, daß sich Benzoesäure zum Konservieren von neutralreagierenden Nahrungsmitteln wenig eignet.

4. Mit steigendem Weinsäuregehalt nimmt die Menge der notwendigen Benzoesäure stark ab.

IV. Warum brauchen wir auf saurem Nährboden weniger Benzoesäure zur Hemmung des Bakterienwachstums als auf neutralem?

Die untereinander übereinstimmenden Tafeln I und II über die Hemmung des Bazillenwachstums (von der Sporenkeimung rede ich im folgenden nicht) lassen sich, wenn wir nur den vierten Tag berücksichtigen, in folgende kurze Form bringen:

Tabelle VII.

ccm Normalweinsäure pro l	0				4,1				8,2				12,3			
ccm Normalbenzoesäure pro l	18,45	20,5	22,55	24,6	0	20,5	22,55	24,6	0	12,3	14,35	16,4	0	10,25	12,3	14,35
Kartoffel	+	+	+		+	+			+	+	+		+	+		
Heu	+	+			+				+	+	+		+	+	+	
Boden	+	+	+		+	+	+		+	+	+		+	+		
Bac. mesent.	+	+	+		+	+			+	+	+		+	+		
Bac. subtilis	+	+			+				+	+			+	+		
Bac. mycoides	+	+			+				+	+			+	+		
Mittel	+	+	±		+	±			+	+	+		+	+		

ccm Normalweinsäure pro l	16,4				20,5				24,6				28,7		32,8	
ccm Normalbenzoesäure pro l	0	6,15	8,2		0	4,1	6,15		0	2,05	4,1		0	2,05	0	2,05
Kartoffel	+	+			+				+	+			+			
Heu	+	+			+	+			+	+			+			
Boden	+	+			+				+	+			+			
Bac. mesent.	+	+			+	+			+	+			+			
Bac. subtilis	+	+			+				+	+			+			
Bac. mycoides	+	+			+	+			+	+			+			
Mittel	+	+			+				+	+			+			

Alle Bakterien sind also auf dem folgenden Nährboden im Wachstum gehemmt:

Alle Angaben in ccm Normalsäure pro l.

Normalweinsäure		Normalbenzoesäure	
Neutral. Bod.	0 ccm	24,6 ccm	Gesamtazidität 24,6
„ „	4,1 „	20,5 „	„ 24,6
„ „	8,2 „	16,4 „	„ 24,6
„ „	12,3 „	12,3 „	„ 24,6
„ „	16,4 „	8,2 „	„ 24,6
„ „	20,5 „	4,1 „	„ 24,6
„ „	24,6 „	4,1 „	„ 28,7
„ „	28,7 „	2,05 „	„ 30,75
„ „	32,8 „	0 „	„ 32,8

Ich habe mir diese Resultate nach den verschiedensten Richtungen hin überlegt und glaube durch die folgende Hypothese die Tatsachen befriedigend erklären zu können: Der Nährboden, auf dem wir unsere Kulturversuche anstellten, bindet eine gewisse Menge Säure (und zwar ganz gleich, ob Benzoesäure oder Weinsäure) chemisch und entzieht sie der Desinfektionswirkung. Damit erklärt sich sehr einfach, daß wir einen Teil der zur Bakterienhemmung notwendigen Benzoesäure ganz glatt durch Weinsäure ersetzen können. Nach den Aufzeichnungen und Kurven hier unten können wir von den 24,6 ccm Benzoesäure, die wir auf dem neutralen Nährboden brauchen, um die Bakterienhemmung zu erreichen, bis zu 20,5 ccm durch Weinsäure ersetzen, ohne die Desinfektionswirkung zu schwächen. Ich nehme also an, daß der Nährboden Säuremengen bis 20,5 ccm Normalsäure bindet und daß die eigentliche Desinfektionswirkung nur den 4,1 ccm freier Benzoesäure zukommt. Vermehren wir den Weinsäuregehalt noch weiter auf Kosten der Benzoesäure, so muß die Gesamtazidität der Mischung 24,6 ccm übersteigen, um zu wirken. Offenbar besitzt die freie Weinsäure eine wesentlich schlechtere desinfektorische Kraft als die freie Benzoesäure. Man könnte aus meinen Versuchen etwa schließen, daß 4,1 ccm Benzoesäure so stark wirken wie 12,3 ccm Weinsäure, oder daß sich die Desinfektionskraft der Weinsäure zu der freien Benzoesäure etwa verhält wie 1 : 3. Dieses Resultat weicht wesentlich von dem ab, das man

findet, wenn man nur erwägt, daß man mit 32,8 ccm Weinsäure so weit kommt wie mit 24,6 ccm Benzoesäure, woraus man eine relative Desinfektionskraft von 24,6 : 32,8 oder 3 : 4 berechnen kann. Es läßt sich aber die Desinfektionskraft der beiden Säuren erst von dem Moment an in Vergleich ziehen, wo die säurebindende Kraft des Nährbodens erschöpft ist. Ich mache darauf aufmerksam, daß diese relative Stärke der Desinfektionskraft von Benzoesäure und Weinsäure nur in einem sehr kleinen Intervall berechnet worden ist, daß also das Verhältnis 1 : 3 nur einen annähernden Wert beanspruchen darf.

Ich gebe jetzt den Inhalt vorstehender Tabellen I bis VI noch einmal in graphischen Darstellungen (Fig. 1 bis 6) und dann ein Bild, das meiner Theorie entspricht (Fig. 7, Seite 16).

Verwendet wurde ein rechtwinkeliges Koordinatensystem. Auf der Abszisse sind die Mengen Weinsäure abgetragen worden, auf der Ordinate die Quantitäten Benzoesäure, die bei den verschiedenen Weinsäurekonzentrationen zur Wachstumshemmung der Bazillen erforderlich waren, alles ausgedrückt in ccm Normalsäure pro 1 Nährboden.

Die ausgezogene Kurve gibt uns also ein Bild der Benzoesäuremengen, die zur Hemmung der Entwicklung der Bazillen nötig sind bei verschiedenem Weinsäuregehalt.

Die gestrichelte Kurve stellt vor die Totalaziditäten der Nährböden, die gerade soviel Weinsäure und Benzoesäure enthalten, daß die Bazillen sich darauf gerade nicht mehr vermehren. Wir erhalten diese gestrichelte Kurve durch Verlängerung der Ordinaten um die zugehörenden Abszissen.

Diese Figuren geben uns die Versuchsresultate in übersichtlicher Form wieder. Wir finden darin z. B. eine Antwort auf die Frage: Wie soll man es machen, wenn man Wachstumshemmung erreichen will bei der kleinsten Totalazidität und dem niedrigsten Benzoesäuregehalt? Weiter ist es möglich, aus den Figuren zu schließen, wieviel Benzoesäure man zur Wachstumshemmung braucht bei willkürlicher Weinsäurekonzentration.

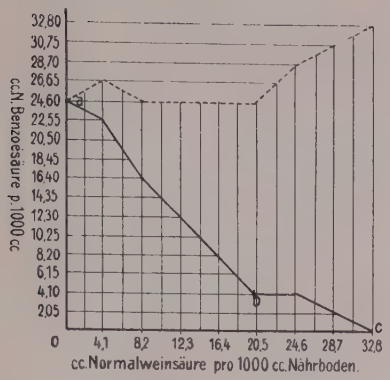

Fig. 1. Bazillus aus Kartoffel.

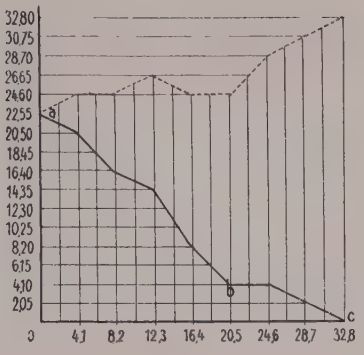

Fig. 2. Bazillus aus Heu.

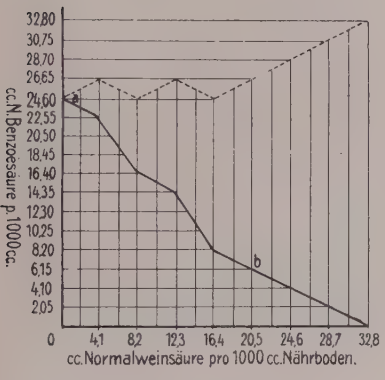

Fig. 3. Bazillus aus Boden.

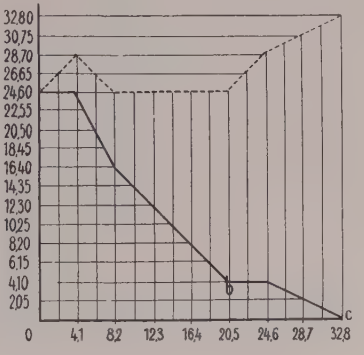

Fig. 4. Bacillus mesentericus.

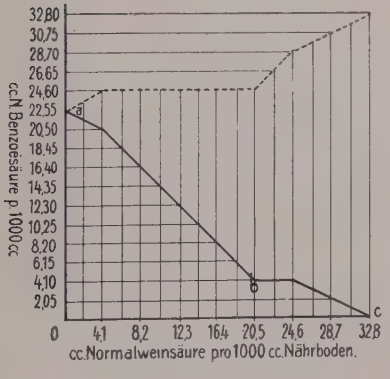

Fig. 5. Bacillus subtilis.

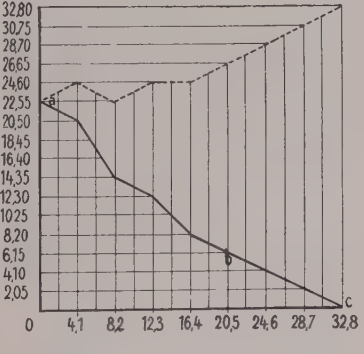

Fig. 6. Bacillus mycoides.

Zum Zeichnen der graphischen Darstellung Fig. 7, die der Theorie entspricht, haben folgende Tatsachen gedient:

Jede 4,1 ccm Normalweinsäure, die wir 1 l Agarnährboden zusetzen, setzt die zur Entwicklungshemmung benötigte Menge Normalbenzoesäure um 4,1 ccm pro l herab. Dies geht so weiter, bis der Nährboden 20,5 ccm Normalweinsäure pro l enthält, die dazugehörende Dosis Normalbenzoesäure beträgt dann 4,1 ccm pro l. Alles dies läßt sich in der Kurve, wie man leicht einsieht, wiedergeben durch die Strecke *ab*.

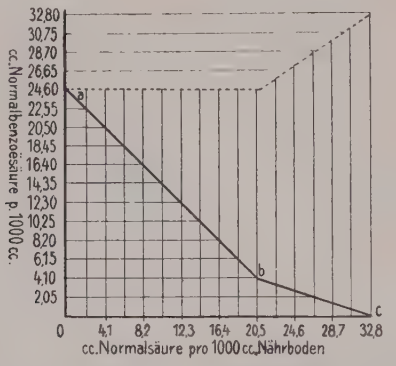

Fig. 7. Graphische Darstellung der Wachstumshemmung der untersuchten Bazillen durch Weinsäure und Benzoesäure, wie die Hypothese es uns erwarten läßt.

Eine weitere Vergrößerung des Weinsäuregehaltes setzt die erforderliche Menge Normalbenzoesäure dann nicht mehr so stark herab, das Säurebindungsvermögen des Nährbodens ist dann erschöpft, jetzt fängt bei *b* die Weinsäure desinfektierend zu wirken an. Oben sahen wir schon, daß sich die Desinfektionskraft der Weinsäure zu der der freien Benzoesäure verhält wie 1 : 3. Vermehrung des Weinsäuregehaltes mit 4,1 ccm verringert dann also die erforderliche Benzoesäuremenge mit $\frac{1}{3} \times 4{,}1$ ccm Normalsäure pro l.

Vermehrung des Weinsäuregehalts um 8,2 ccm verringert den Benzoesäuregehalt um $\frac{1}{3} \times 8{,}2 = \frac{2}{3} \times 4{,}1$ ccm pro l. Vermehrung des Weinsäuregehalts um 12,3 ccm verringert den Benzoesäuregehalt um $\frac{1}{3} \times 12{,}3$ ccm $= \frac{3}{3} \times 4{,}1$ ccm, d. h. man braucht

dann keine Benzoesäure zur Entwicklungshemmung mehr. Dies läßt sich in der Kurve wiedergeben durch die Strecke *bc*.

Im wesentlichen stimmt meine theoretische Kurve — die ja auch nur eine Annäherung an die Wahrheit darstellen kann — recht gut mit den Versuchskurven.

Besonders gilt das für die Strecke *ab*. Daß die Strecke *bc* etwas von der Theorie da und dort abweicht, dürfte namentlich zwei Gründe haben. Wie oben angegeben, wurde die Ausgangsneutralität des Nährbodens nach Titrieren von nur 10 ccm hergestellt. Dadurch lassen sich aber keine absolut genau gleichmäßigen Alkalinitäten für 1 l herstellen. Es war also die Reaktion der als neutral angenommenen Ausgangsnährböden nicht ganz gleich, und zweitens waren die Intervalle, in denen ich die Benzoesäurewirkung prüfte, trotz ihrer absoluten Kleinheit doch noch relativ zu groß, um nicht einzelne unschöne Zacken in den Kurven zu erzeugen.

V. Einige Kontrollversuche über die Wirkungen von Schwefelsäure und Benzoesäure.

Es lag nahe, die Versuche, die Wirkung der Benzoesäure zu verstärken, noch mit einer anderen Säure durchzuführen. Ich wählte dazu mit Absicht eine anorganische Säure, der niemand irgendeine spezifische Desinfektionswirkung zugeschrieben hat. Es mußte natürlich wieder eine Säure sein, die stärker wie die Benzoesäure wirkt und sie aus ihren Salzen befreit, daher wurde die Schwefelsäure verwendet.

Aus den vielen hierüber angestellten Versuchen teile ich, um Wiederholungen zu vermeiden, nur in einer Tabelle die Endresultate mit.

Am vierten Tag waren bei beifolgenden Aziditäten folgende Resultate der Säurehemmung auf sporenfreie Bazillen erreicht:

Tabelle VIII.

ccm Normalschwefelsäure pro 1 l	4,1							8,2					12,3				
ccm Normalbenzoesäure pro 1 l	0	8,7	16,4	18,45	20,5	22,55	24,6	0	8,2	12,3	14,35	16,4	0	8,2	10,25	12,3	14,35
Kartoffel	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—
Heu	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—
Boden	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—
Bac. mesent. . .	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—
Bac. subtilis . . .	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—
Bac. mycoides . .	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—

ccm Normalschwefelsäure pro 1 l	16,4					20,5				24,6			28,7			32,8	
ccm Normalbenzoesäure pro 1 l	0	2,05	4,1	6,15	8,2	0	2,05	4,1	6,15	0	2,05	4,1	0	2,05	4,1	0	2,5
Kartoffel	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—
Heu	+	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—
Boden	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—
Bac. mesent. . .	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—
Bac. subtilis . .	+	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	—	+	—	—	—	—
Bac. mycoides . .	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—

In graphischer Darstellung ergibt diese Tabelle 5 Figuren (8 bis 12), die eine vollkommene Bestätigung gegenüber den früheren Versuchen darstellen.

Auch hier bedeutet die Knickung der Benzoesäurekurve auf der Strecke *b c* der Figuren 8 bis 12 keinen Einwand gegen meine Erklärung, sie kommt gleichwie oben davon her, daß nicht genügend dicht aufeinander folgende Konzentrationen von Benzoesäure untersucht worden sind.

VI. Welche Stoffe in unseren Agarnährböden sind die Säurebinder?

Zwei Möglichkeiten drängen sich bei der Überlegung auf: Einmal wird nicht zu bezweifeln sein, daß die eiweißartigen Körper, vor allem die unseren Nährböden zugesetzten Peptone

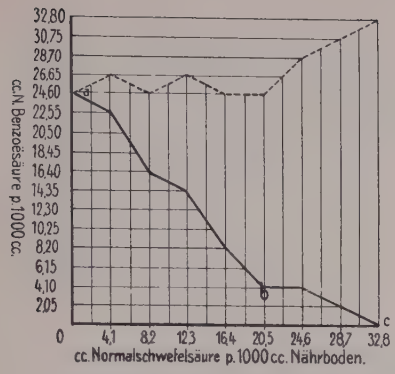

Fig. 8. Bazillus aus Kartoffel.

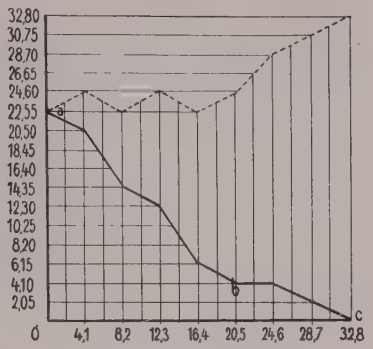

Fig. 9. Bazillus aus Heu.

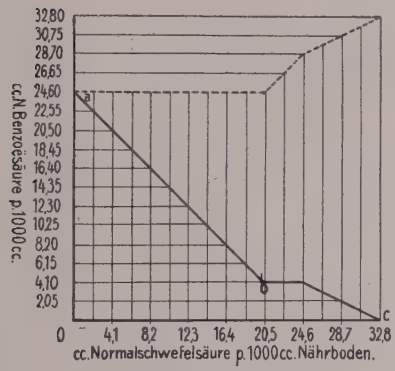

Fig. 10. Bazillus aus Boden und Bacillus mesentericus.

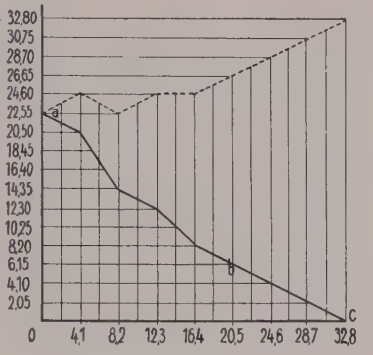

Fig. 11. Bacillus subtilis.

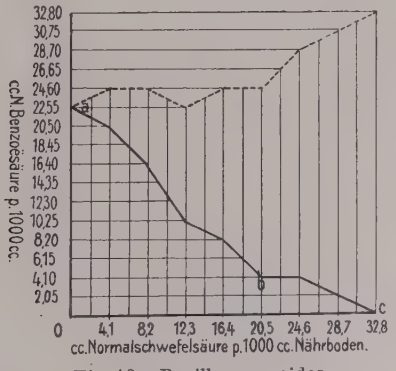

Fig. 12. Bacillus mycoides.

Säure binden. (S. u.) Damit stimmt gut überein, daß die Konservierung sehr stark eiweißhaltiger Nahrungsmittel speziell mit Borsäure und Benzoesäure auf große Schwierigkeiten stößt. Zweitens schien es möglich, daß das Kolloid Agar, obwohl es ein indifferentes Kohlehydrat ist, die Säurewirkung schwäche. Diese zweite Annahme habe ich durch einen Versuch als richtig erweisen können, indem ich Bouillon von neutraler Reaktion bei Zusatz von verschiedenen Benzoesäure- und Weinsäuremengen verwendete.

Es wird verwendet eine Bouillon aus 1000 ccm Aqua dest., 10 g Pepton, 5 g Kochsalz, 10 g Liebig von neutraler Reaktion.

Tabelle IX.

Bouillon ohne Agar nach 4 Tagen im Brutschrank:

ccm Normalweinsäure pro 1 l Nährboden	0				8,2		16,4		24,6	32,8
ccm Normalbenzoesäure pro 1 l Nährboden	0	8,2	16,4	24,6	12,3	16,4	8,2	16,4	4,1	0
Bazillus von Kartoffel	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
Bazillus aus Heu. . .	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
Bazillus aus Boden .	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
Bac. mesent.	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+
Bac. subtilis	+	+	+	+	+	—	+	—	+	—
Bac. mycoides	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+

Das Resultat ist, verglichen mit den oben mitgeteilten Agarversuchen, unzweifelhaft das, daß auf dem agarhaltigen Nährboden etwas weniger Benzoesäure notwendig ist als auf der Bouillon. Ich kann dies nicht sicher erklären, konstatiere aber, daß Laubenheimer und Warr schon Ähnliches gefunden haben. Das Wachstum auf Agar gestattet keine so gute Diffusion der Stoffwechselprodukte — ob diese Erklärung aber genügt?

Noch interessanter sind meine Versuche ausgefallen, inwieweit Pepton Säure bindet. Wie die vorige Tabelle zeigt, brauchen wir in einer gewöhnlichen neutralen Bouillonkultur mehr als 24,6 ccm Normalbenzoesäure pro l, um Wachstumshemmung hervorzubringen.

Ich habe aus meinen früheren Versuchen geschlossen, daß die Menge freier Benzoesäure, die notwendig ist, wenn die säurebindenden Körper durch Weinsäure gesättigt sind, 4,1 ccm Normalsäure pro l beträgt. — Verdünnt man die Bouillon zehnfach, so daß die Menge des säurebindenden Peptons ganz klein wird, so muß man mit der theoretischen Menge 4,1 annähernd auskommen.

Versuche mit einem Nährboden aus 9 Teilen Aqua dest., 1 Teil gewöhnliche Bouillon.

Tabelle X.

Nach 4 Tagen im Brutschrank:

ccm Normalweinsäure pro 1 l Nährboden	0				8,2		16,4		24,6	32,8
ccm Normalbenzoesäure pro 1 l Nährboden	0	6,15	8,2	16,4	6,15	8,2	4,1	6,15	2,05	0
Bazillus von Kartoffel	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bazillus aus Heu. . .	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bazillus aus Boden .	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bac. mesent.	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bac. subtilis	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bac. mycoides	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Nach dieser Tabelle kann ich sagen, daß eine Menge von 6,15 ccm Normalbenzoesäure pro l ausreicht, auf neutraler, mit 9 Teilen Wasser verdünnter Bouillon Wachstumshemmung zu erzielen. Wahrscheinlich würde ich mit noch etwas geringerer Konzentration (gegen 4,1) dasselbe Resultat erzielt haben. Ich beabsichtigte, noch einige Versuche mit kleineren Mengen Benzoesäure zu machen, mußte aber die Versuche abbrechen,

Ein ganz ähnliches Resultat erhielt ich, als ich einen neutralen Nährboden aus 1000 g Wasser und 5 g Fleischextrakt, 5 g Traubenzucker, 2,5 g Kochsalz, ¾ g Ammoniumsulfat herstellte, wobei Pepton ganz weggelassen wurde. Meine sämtlichen sechs Bazillen gaben genau das gleiche Resultat, wie ich es oben angeführt habe. Von 6,15 ccm Normalbenzoesäure pro l ab war eine vollständige Hemmung vorhanden. Leider sind auch hier keine noch schwächeren Konzentrationen untersucht worden.

Ich bin also vollkommen überzeugt, im Pepton den Hemmungsstoff, den Säurebinder gefunden zu haben. Benzoesäure entfaltet ihre größte Wirkung auf säurereichen, peptonarmen (resp. eiweißarmen) Nährböden.

VII. Einige Versuche über das Wachstum von Penicillium glaucum auf benzoe- und weinsäurehaltigen Nährböden.

Die Nährböden wurden genau in gleicher Weise hergestellt wie in früheren Versuchen, die Kulturen auf Agarplatten angelegt.

Tabelle XI.

Nach 6 Tagen bei Zimmertemperatur:

ccm Normalweinsäure pro 1 l Nährboden	0				4,1				8,2				12,3			
ccm Normalbenzoesäure pro 1 l Nährboden	0	20,5	22,55	24,6	0	20,5	22,55	24,6	0	16,4	18,45	20,5	0	14,35	16,4	18,45
	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	–

ccm Normalweinsäure pro 1 l Nährboden	16,4				20,5				24,6				32,8		
ccm Normalbenzoesäure pro 1 l Nährboden	0	8,2	10,25	12,3	0	6,15	8,20	10,25	0	4,1	6,15	8,20	0	2,05	
	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	

Wie die Hemmung des Wachstums von Penicillium glaucum durch Weinsäure und Benzoesäure sich verhält, sieht man in der Tabelle XI. Bei diesem entwicklungshemmenden Versuch mit Schimmelpilzen mußte man, da eine wässerige Aufschwemmung von Pilzen herzustellen nicht möglich war, den verwendeten, mit der gewünschten Menge Benzoesäure versehenen Agar als besten Nährboden nach dem Erstarren in der Petrischale mit steriler Platinöse aus einer Penicillium glaucum-Kultur beschicken.

Auch hier findet man die benötigte Benzoesäuredosis desto kleiner, je größer die gebrauchte Weinsäuremenge ist.

Bei Zunahme der Weinsäuremenge nimmt aber bei Penic. glaucum die zur Entwicklungshemmung erforderliche Menge Benzoesäure nicht so rasch ab, wie dieses bei den Bazillen der Fall ist.

Es ist sehr gut möglich, daß dies verursacht wird dadurch, daß die Hemmung, welche die Weinsäure auf das Bazillenwachstum ausübt, wieder zum Teil ausgeglichen wird durch die bessere Nahrung, die dem Schimmel bei Weinsäurezugabe geboten wird. Wir wissen ja doch, daß die meisten Schimmelpilze die organischen Säuren wie Zitronensäure, Weinsäure, Apfelsäure usw. sehr lieben; wir brauchen nur zu bedenken, wie leicht Äpfel, Zitronen und andere Früchte schimmeln. Die genannten organischen Säuren sind gute Kohlenstoffquellen für die Schimmelpilze (Lafar).

Daß Weinsäure ein guter Nährboden für Schimmelpilze ist, können wir auch schließen aus der Tatsache, daß eine einige Wochen in einer verschlossenen Flasche aufbewahrte Normalweinsäurelösung schimmelt. Von einer Normalschwefelsäurelösung sehen wir so etwas niemals.

Vergleichen wir jetzt einmal die Benzoesäuremengen, die erforderlich sind, um das Wachstum von Penic. glaucum zu hemmen, mit den Benzoesäuremengen, die wir als nötig gefunden haben, um das Bazillenwachstum zu hemmen!

Tabelle XII.

ccm Normalweinsäure pro 1 neutr. Agar	0	4,1	8,2	12,3	16,4	20,5	24,6
ccm Normalbenzoesäure pro 1 neutral. Agar							
Penicillium	24,6	24,6	20,5	18,45	12,3	10,25	8,2
Bazillen	24,6	22,55	16,4	12,3	8,2	4,1	4,1
Differenz	0	2,05	4,1	6,15	4,1	6,15	4,1

Jetzt vergleichen wir noch einmal dieselben Resultate des Penicilliumversuches mit den theoretisch für die Bazillen berechneten Werten:

Tabelle XIII.

ccm Normalweinsäure pro 1 neutr. Agar	0	4,1	8,2	12,3	16,4	20,5	24,6
ccm Normalbenzoesäure pro 1 neutr. Agar							
Penicillium	24,6	24,6	20,5	18,45	12,3	10,25	8,2
Bazillen (theor.)	24,6	20,5	16,4	12,3	8,2	4,1	4,1
Differenz	0	4,1	4,1	6,15	4,1	6,15	4,1

Aus den Resultaten dieser zwei Tabellen glaube ich schließen zu dürfen, daß die Differenz auf neutralem Boden = 0, auf saurem Boden immer ca. 4,1 ccm beträgt, gleichgültig, ob viel oder wenig Weinsäure im Nährboden anwesend ist.

Der wahrscheinliche Grund scheint mir der, daß Schimmelpilze (etwa um 4,1) stärker säuretolerant oder besser wohl azidophil sind als Bakterien.

Auch die Resultate dieses Penicilliumversuches habe ich graphisch dargestellt (Fig. 13).

Graphische Darstellung der Wachstumshemmung von Penicillium glaucum durch Weinsäure und Benzoesäure.

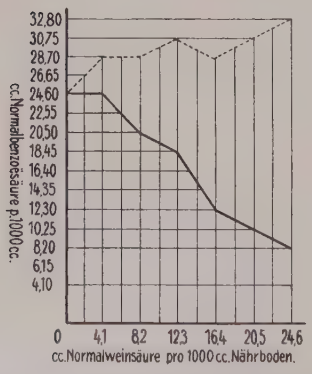

Fig. 13. Konstruiert aus den Versuchsresultaten.

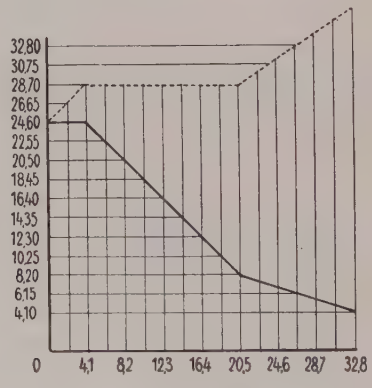

Fig. 14. Wie die Hypothese sie uns erwarten läßt.

Daneben findet man ein Bild (Fig. 14) der Wachstumshemmung von Penicillium glaucum durch Benzoe- und Weinsäure, wie die Theorie sie erfordert.

Die Zahlen, die zum Aufbau dieser graphischen Darstellung dienten, bekam ich durch Vermehrung der theoretisch für die Bazillen berechneten Werte mit 4,1 (die Schimmelpilze sind um etwa 4,1 ccm Normalsäure pro 1 mehr säuretolerant als die Bazillen).

Die Erklärung ist übrigens dieselbe wie bei den anderen graphischen Darstellungen.

Auch diese theoretische graphische Darstellung zeigt wieder viel Ähnlichkeit mit der graphischen Darstellung Fig. 13, die aus Versuchsresultaten zusammengesetzt ist.

VIII. Wird die Toxinbildung durch Benzoesäure vielleicht früher gehemmt als die Vermehrung der Bazillen?

Prof. R. H. Saltet und Zeehandelaar züchteten Bacillus botulinus van Ermengem anaerobiontisch in Bouillon mit 1% Glukose.

Pro 100 ccm war 0,75, 1,2, 2,4 und 4,8 ccm einer Normalsodalösung zugesetzt. Verwendet wurde eine toxische Kultur aus dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin.

Nachdem die Bouillon deutlich getrübt war, wurde Meerschweinchen von etwa 225 g 0,1 ccm der Kulturflüssigkeit unter die Bauchhaut injiziert.

Drei der vier Versuchstiere blieben am Leben, nur das Tier, das mit der meist alkalischen Flüssigkeit eingespritzt worden war, starb nach 3½ Tagen.

Noch einmal wiederholt, dasselbe Resultat.

Die tötende Menge Toxin war also wohl gebildet in der Glukosebouillon mit 4,8% Normalsodalösung und nicht in der Bouillon mit niedrigerem Alkaligehalt.

Danach wiederholten sie die Versuche mit der Bouillon mit 4,8% Normalsodalösung, mit Zusatz 40prozentigem Formalin.

Alkaligehalt in % N. Soda	Formalingehalt	Wachstum	Meerschweinchen tot + nicht tot −
4,8	1 : 120 000	+	+ nach 3½ Tagen
	1 : 80 000	+	+ nach 5 Tagen
	1 : 20 000	+	−
	1 : 10 000	−	−

Eine Wiederholung des Versuches mit salizylsaurem Natrium statt Formalin gab folgende Resultate:

Alkaligehalt in % N. Soda	Salizyls. Natrium-gehalt	Wachstum	tot + nicht tot −
4,8	1 : 5000	+	+ nach 4 Tagen
	1 : 4000	+	+ nach 5 Tagen
	1 : 2500	−	−
	1 : 1000	−	−

Bei einem Alkaligehalt von 4,8% hemmt Formalin 1 : 10 000 also das Wachstum von Bacillus botulinus. Formalinkonzentration 1 : 20000 oder niedriger gestattet die Vermehrung der Bazillen, Formalingehalt 1 : 80000 oder niedriger auch die Bildung der Toxine.

Die Toxinbildung wird also früher durch Formalin gestört als das Wachstum der Bazillen.

Salizylsaures Natrium 1 : 2500 hemmt das Wachstum des Botulinusbazillus. Bei Salicylas natricus-Konzentration 1 : 4000 oder niedriger wächst der Bazillus, bildet aber weniger Toxine.

Dieser Versuch von Saltet und Zeehandelaar gab mir Veranlassung, den Einfluß von Benzoesäure auf die Toxinebildung zu studieren.

Auch ich arbeitete mit Bacillus botulinus aus dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin.

Ich züchtete ihn in Pferdeleberbouillon, die nach dem Verfahren von E. Pfuhl hergestellt wurde. Diese Bouillon hatte eine braune Farbe, auf dunklem Grunde opaleszierend; gegen das Licht gehalten erschien sie aber ganz klar und durchsichtig.

Da Saltet und Zeehandelaar fanden, daß der Botulinusbazillus nur Toxine bildet, wenn der Normalalkaligehalt wenigstens 4,8% beträgt, setzte ich meinem Nährboden 5% Normalsodalösung zu.

In dieser alkalischen Leberbouillon wachsen die Bazillen bei 22° nicht oder nur kümmerlich.

Befand sich aber am Boden der Röhrchen ein Stückchen steriler, gekochter Pferdeleber, dann folgte kräftiges Wachstum (Verfahren nach K. Würcker).

Etwa vom zweiten Tag nach der Aussaat an trat reichliche Gärung und ranziger Geruch nach Buttersäure auf und trübte sich die Bouillon. Nach etwa vier Tagen klärte sich die Bouillon wieder, am Boden der Röhrchen befand sich dann eine etwa ½ ccm dicke Schicht, die sich mikroskopisch aus Sporen bestehend erwies.

Diese letzte Methode war hier aber nicht brauchbar, weil ich meinen Nährböden Benzoesäure zusetzen wollte und Eiweiß c. q. Lebersubstanz, wie wir oben lernten, die Konservierungskraft der Benzoesäure herabsetzt.

Am besten war das Wachstum in alkalischer Pferdeleberbouillon mit dem Pyrogallolverfahren (H. Buchner). Ich stellte mir jetzt eine Pferdeleberbouillon her, die in 1 l 5% Normalalkalilösung und außerdem respekt. 1, 2, 3, 4, 5 und 6‰ Benzoesäure enthielt, impfte diese Nährböden mit Bacillus botulinus und stellte sie mit einer alkalischen Pyrogallollösung in eine gut verschlossene Flasche und bewahrte sie während vier Tagen bei 22°.

In der Bouillon mit 6‰ Benzoesäure wuchsen die Bazillen nicht; in der Bouillon mit weniger Benzoesäure dagegen sehr üppig, am Ende des vierten Tages war die Sporenschicht in den Röhrchen mit 5‰ Benzoesäure gar nicht dünner als die in den Röhrchen mit 0‰ Benzoesäure. Offenbar wurde das Wachstum der Bazillen durch 5‰ Benzoesäure noch nicht merklich behindert.

Daß wir in dieser Bouillon zur Hemmung des Wachstums von Bacillus botulinus so viel mehr Benzoesäure brauchen als bei Bac. mesentericus usw. in den vorigen Versuchen, liegt zweifellos daran, daß das Alkali die Benzoesäure zu Natriumbenzoat bindet, ein Stoff, der weniger stark desinfektierend wirkt. Überdies ist es möglich, daß die Botulinusbazillen mehr benzoesäuretolerant sind.

Den Nährböden, auf welchen die Bazillen gewachsen waren, wurde nun am Ende des vierten Tages 0,1 ccm Kulturflüssigkeit entnommen und Kaninchen von etwa 1400 g unter die Bauchhaut eingespritzt.

Kulturflüssigkeit mit:	Benzoesäure					
	0‰	1‰	2‰	3‰	4‰	5‰
Kaninchen gestorben nach	18 Std.	22 Std.	28 Std.	2 Tagen	3 Tagen	5 Tagen

Einmal wiederholt mit filtrierten Kulturen, dieselben Resultate: Einspritzung von 0,1 ccm Kulturflüssigkeit bei Meerschweinchen von etwa 400 g unter die Bauchhaut gab folgende Resultate:

Benzoesäuregehalt	0‰	1‰	2‰	3‰	4‰	5‰
Meerschweinchen gestorben nach . . .	24 Std.	24 Std.	30 Std.	2 Tagen	$3^1/_2$ Tagen	4 Tagen

Nach Wiederholung fand ich:

Benzoesäuregehalt	0‰	1‰	2‰	3‰	4‰	5‰
Meerschweinchen gestorben nach . . .	24 Std.	24 Std.	24 Std.	32 Std.	2 Tagen	3 Tagen

Benzoesäure verringert also die Toxinbildung von Bacillus botulinus; je mehr Benzoesäure sich im Nährboden befindet, desto weniger Gift wird gebildet, oder besser, desto weniger toxisch ist die Kulturflüssigkeit. Daß eine Benzoesäurekonzentration existiert, bei welcher die Toxinbildung vollkommen aufhört, die Bazillen aber doch noch wachsen, ist immer noch sehr gut möglich, doch jedenfalls wird diese so dicht liegen bei der Benzoesäurekonzentration, bei welcher das Bazillenwachstum gehemmt ist, daß es praktisch ganz ohne Bedeutung ist.

Die Meerschweinchen zeigen fast alle die gleichen Krankheitserscheinungen. Das Botulinustoxin ruft eine oft vollständige Paralyse sämtlicher Muskeln hervor, so daß der Körper des Tieres gänzlich erschlafft erscheint. Die Entspannung der Bauchmuskeln, die beim Anfassen der kranken Tiere fühlbar wird, bildet öfters das erste Zeichen der Krankheit. Dieses Symptom ist sehr auffällig.

Die Tiere sind unbeweglich, halten die Beine gestreckt, liegen stimmlos auf dem Bauche. Die Atmung ist zuerst rasch und oberflächlich, später wird sie langsamer. Unter Einziehung der Interkostalräume treten dyspnöische Anfälle auf.

Wenn die Tiere dem Gift lange widerstehen, sieht man oft verschiedene partielle Paralysen, so z. B. die Lähmung der Hinterbeine.

Kaninchen verhalten sich ähnlich:

Oft sieht man, daß die Paralyse nur gewisse Muskelgruppen befällt. Die Tiere halten den Kopf seitlich gesenkt, die vordern Extremitäten sind gestreckt, die hintern am Bauch angezogen. In dieser Lage verharren die Tiere unbeweglich bis zum Tode.

Auch kommt es vor, daß nur die Hinterbeine paralysiert sind, das Tier schleppt sich dann mit Mühe fort auf den vorderen Extremitäten.

Eine reichliche Speichelabsonderung habe ich aber niemals dabei beobachtet, ebensowenig wie Pupillenerweiterung mit Schlaffheit des dritten Lides und Exophthalmus.

Aphonie und Anorexie mit Harn und Kotretention gehören dagegen zu den regelmäßigen Erscheinungen.

IX. Über die Stärken der Säuren.

Oben wurde stillschweigend angenommen, daß Schwefelsäure und Weinsäure stärker sind als Benzoesäure. Ich werde jetzt die Richtigkeit dieser Annahme durch einige Zahlen zeigen.

Was versteht man aber unter der Stärke einer Säure. Die Stärke einer Säure hängt ab von ihrer elektrolytischen Dissoziation.

Eine Säure A ist also stärker als eine Säure B, wenn sie in dem gleichen Lösungsmittel, in derselben Konzentration und bei derselben Temperatur stärker elektrolytisch dissoziiert ist als Säure B.

Als Maß für diese elektrolytische Spaltung dient K, die Dissoziationskonstante.

Deutlichkeitshalber wollen wir einmal rasch wiederholen, wie man dazu kommt.

In einer verdünnten Lösung einer Säure, z. B. Benzoesäure, gibt es folgende Gleichgewichtsreaktion:

$$C_6H_5COOH \rightleftarrows C_6H_5COO' + H^{\cdot}.$$

Das Gesetz der chemischen Massenwirkung lautet: „Bei jeder chemischen Reaktion in einem homogenen System ist bei konstanter Temperatur die chemische Wirkung proportional mit der Konzentration der reagierenden Bestandteile."

Die Konzentration C wird ausgedrückt in Grammolekülen pro Liter.

Die Schnelligkeit der Reaktion von links nach rechts ist also

$$V_1 = K_1 \times C_{C_6H_5COOH}.$$

K_1 ist eine Konstante.

Die Schnelligkeit der Reaktion von rechts nach links

$$V_2 = K_2 \times C_{C_6H_5COO'} \times C_{H^{\cdot}}.$$

K_2 ist wieder eine Konstante.

Da es Gleichgewicht gibt, ist

$$V_1 = V_2.$$

Also

$$K_1 \times C_{C_6H_5COOH} = K_2 \times C_{C_6H_5COO'} \times C_{H^{\cdot}}$$

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{C_{C_6H_5COO'} \times C_{H^{\cdot}}}{C_{C_6H_5COOH}} = K.$$

K = die Gleichgewichtskonstante.

Nehmen wir nun an, daß 1 Grammolekül Benzoesäure in V Liter Wasser gelöst ist und daß von diesem Grammolekül

Benzoesäure α Grammoleküle in Ionen gespalten sind, dann befinden sich in der Lösung

$1 - \alpha$ Grammoleküle ungespaltene Benzoesäuremoleküle,
α Grammoleküle gespaltene Benzoesäuremoleküle, d. h. α Gramionen $C_6H_5COO' + \alpha$ Gramionen $H^{\cdot}$. Also:

$$K = \frac{\frac{\alpha}{V} \times \frac{\alpha}{V}}{\frac{1-\alpha}{V}} \text{ oder } KV = \frac{\alpha^2}{1-\alpha}.$$

Dies ist das Verdünnungsgesetz von Ostwald. Je größer V ist, desto größer wird α, d. h. mit der Verdünnung nimmt die elektrolytische Spaltung zu. Ist $V = 1$, dann haben wir $K = \frac{\alpha^2}{1-\alpha}$. Wird α größer, dann wird, wenn $V = 1$ bleibt, K größer. Je stärker ein Elektrolyt dissoziiert ist, um so größer ist α, also desto größer ist K, die Dissoziationskonstante. K, die Dissoziationskonstante, ist also ein Maß für die Stärke einer Säure.

Nun ist 100 K bei 25° C:

für Weinsäure = 0,097,
für Benzoesäure = 0,006.

$$K_{\text{Weinsäure}} = 16{,}16 \times K_{\text{Benzoesäure}}.$$

Wenn man Schwefelsäure in Wasser löst, findet eine stufenweise Dissoziation statt.

Bei mäßiger Verdünnung

$$H_2SO_4 \rightleftarrows H^{\cdot} + HSO_4'.$$

Bei starker Verdünnung:

$$HSO_4' \rightleftarrows H^{\cdot} + SO_4'.$$

Nach Enklar ist die Dissoziationskonstante für die erste Stufe bei 18° C 0,45 und für die zweite Stufe 0,017 bis 0,018.

Bestimmen wir nun aus $K_{\text{Benzoesäure}} = 0{,}00006 = \frac{\alpha^2}{1-\alpha}$ α, dann finden wir $\alpha = 0{,}0077$.

Auf dieselbe Weise finden wir $\alpha_{\text{Weinsäure}} = 0{,}031$.

In der Benzoesäurelösung (1 Grammolekül pro Liter) ist also von jedem Grammoleküle 0,0077 in Ionen gespalten, das heißt 0,77%.

In einer Weinsäurelösung der gleichen Stärke ist von jedem Grammoleküle 0,031 Grammolekül dissoziiert, das ist 3,1%.

Weinsäure ist also 4 mal so stark wie Benzoesäure.

Auf ähnliche Weise kann man nun berechnen, daß Schwefelsäure viel stärker ist als Weinsäure und Benzoesäure. Anorganische Säuren sind alle viel stärker als die organischen.

Bringen wir in eine Benzoesäurelösung eine stärkere Säure, z. B. Weinsäure oder Schwefelsäure, dann geht die Dissoziation der Benzoesäure zurück.

In der Benzoesäurelösung hatten wir das Gleichgewicht:

$$C_6H_5COOH \rightleftarrows C_6H_5COO' + H^{\cdot}.$$

Weil Benzoesäure nur eine sehr schwache Säure ist, gehört in diesem Gleichgewicht eine sehr kleine Konzentration der $H^{\cdot}$-Ionen (wie wir oben sahen, in einer Lösung von 1 Grammol. pro Liter nur 0,77%).

Durch Zusatz von einer stärkeren Säure wird die Konzentration der $H^{\cdot}$-Ionen größer.

Um Gleichgewicht zu behalten, muß nun auf Grund von

$$K = \frac{C_{C_6H_5COO'} \times C_{H^{\cdot}}}{C_{C_6H_5COOH}}$$

die Konzentration der C_6H_5COO'-Ionen abnehmen und die Konzentration der ungespaltenen Benzoesäuremoleküle zunehmen, mit anderen Worten, Benzoesäure zurückgebildet werden.

Man kann nun auch leicht einsehen, wie es möglich ist, daß eine starke Säure eine schwache Säure aus seinen Salzen verdrängen kann.

In einer verdünnten Lösung sind die meisten Salze fast ganz in Ionen gespalten.

Setzen wir nun z. B. einer Natriumbenzoatlösung (von 1 Grammol. pro Liter) Salzsäure zu, dann haben wir in der Lösung:

$$Na^{\cdot} + C_6H_5COO' + H^{\cdot} + Cl'.$$

Da das Gleichgewicht $C_6H_5COOH \rightleftarrows C_6H_5COO' + H^{\cdot}$ nur bestehen kann, wenn 0,77% $H^{\cdot}$ und C_6H_5COO'-Ionen da sind, enthält diese Flüssigkeit viel mehr dieser Ionen, als das Gleichgewicht erlaubt.

Also $H^{\cdot}$ und C_6H_5COO'-Ionen verbinden sich zu C_6H_5COOH. Die Cl' und $Na^{\cdot}$-Ionen bleiben nebeneinander bestehen. Kochsalz ist entstanden.

Das Obenstehende gilt nur für sehr verdünnte Lösungen; für organische Elektrolyte bis zu einer Konzentration von ½ Grammol. pro Liter und für anorganische Elektrolyte nur bis zu einer Konzentration von 0,08 Grammol. pro Liter.

Die größte Säuremenge, die wir in unseren Versuchen zugesetzt haben, war 32,8 ccm Normalsäure pro Liter. In einem Liter dieser Lösung war also $\frac{32,8}{1000}$ Liter Normalsäure, d. h. weil Weinsäure und Schwefelsäure gebraucht worden sind $\frac{16,4}{1000} =$ 0,0164 Grammol.

Die größte verwendete Benzoesäuremenge war pro Liter 24,6 ccm Normalbenzoesäure $= \frac{24,6}{1000} = 0,0246$ Grammolekül pro Liter.

Für unsere Säurekonzentrationen treffen die Gesetze der elektrolytischen Dissoziation also noch zu.

Doch dürfen wir diese Gesetze zu unseren Versuchen eigentlich nicht anwenden, weil wir nicht mit einem homogenen System gearbeitet haben.

Ich glaube aber, daß wir keinen großen Fehler machen, wenn wir sie doch zur Anwendung bringen, weil der Agarnährboden sich jedenfalls beim Schmelzen einem homogenen System sehr nähert.

X. Wie soll man sich die desinfizierende Wirkung der Benzoesäure denken?

Das Desinfiziens wirkt auf die Bakterienzelle in der Art, daß es ihre lebenswichtigen Bestandteile verändert. Die Lebensfunktionen der Bakterienzelle sind wie bei jeder andern Zelle an

ihr Protoplasma, ein Gemenge von Kolloiden, vornehmlich von Eiweißstoffen und Lipoiden, meist noch unbekannten Stoffen von fettähnlichen Lösungsverhältnissen, gebunden.

Eine Änderung in der Zusammensetzung des Protoplasmas durch eingedrungene Stoffe, in chemischem oder chemisch-physikalischem Sinn, bedeutet also ein Krankwerden oder gar den Tod des Bakterienleibes.

Um aber in die Bakterienzelle eindringen zu können, muß zunächst die Zellmembran von dem Desinfiziens in Angriff genommen werden. Diese Membran ist für lipoidlösliche Stoffe, wie die Phenole, Kresole, den Alkohol, Sublimat, Jod und Osmiumsäure leicht durchgängig.

Ihre Reaktion mit der Grenzschicht des Zellprotoplasmas geht nach dem Overtonschen Gesetz vonstatten: Wenn die Fremdsubstanzen aus einem wässerigen Medium in die Zellen eindringen, so hängt ihre Aufnahme von den Teilungskoeffizienten ihrer Löslichkeit einerseits in Wasser und anderseits in fettartigen Lösungsmitteln ab.

Die nicht lipoidlöslichen Substanzen wie die meisten Salze, die Alkalien und die organischen Säuren dringen nur dadurch in das Zellinnere ein, daß sie eiweißfällend oder eiweißlösend die Außenschichten der Bakterien zerstören.

Ihre Desinfektionskraft ist abhängig von dem Dissoziationsgrad der Lösungen, sie ist also eine Ionenreaktion.

Außer diesen beiden Hauptgruppen von Desinfizientien, die nur durch ihre Lipoidlöslichkeit oder nur nach dem Dissoziationsgrad ihrer Lösungen wirken, gibt es eine Reihe anderer Stoffe, die dadurch wirksam sind, daß sie sowohl lipoidlöslich als auch eiweißfällend sind. Hierdurch wird die Ausnahmestellung des Sublimats bedingt.

Während viele Quecksilbersalze in ihrer Lösung viel stärker dissoziiert sind als Quecksilberchlorid, so ist das Chlorid ihnen noch bedeutend an Desinfektionskraft überlegen. Es dringt kraft der Lipoidlöslichkeit, die es vor den anderen Salzen voraus hat, schneller in den Bakterienleib ein.

Die Desinfektionskraft der Säuren steht im allgemeinen in direktem Verhältnis zu ihrem Dissoziationsgrad, d. h. entspricht der Konzentration der in der Lösung vorhandenen Wasserstoffionen. Es desinfizieren also Salzsäure und andere starke Säuren stark, die mittelstarken wie Phosphorsäure schwächer. Dagegen ist die desinfizierende Kraft der organischen Säuren, wie Ameisensäure, Essigsäure usw., eine viel größere, als ihrem Dissoziationsgrad entspricht. Eine Erklärung findet Overton darin, daß die undissoziierten Moleküle dieser ätherlöslichen Säuren in den Lipoiden löslich sind und dadurch leichter in die Zellen eindringen.

Die Desinfizientien aus der aromatischen Reihe (Phenole, Kresole) wirken, da sie schwach ionisiert sind, z. B. das Phenol, nicht durch das Ion C_6H_5, sondern als ungespaltenes Molekül.

Mit dieser Wirkungsweise hängt auch der Umstand zusammen, daß die Desinfektionskraft des Phenols, des Kresols durch Zusatz von Salzen erheblich gesteigert wird, indem durch das Aussalzen die Löslichkeit des Phenols in Wasser verringert, der Teilungskoeffizient zwischen dem Medium und der Zelle ein günstiger wird und dadurch das Eindringen des Phenols in die Zelle ein reichlicheres wird (Spiro und Bruns).

Benzoesäure ist eine sehr schwache Säure und ist also sehr wenig in Ionen gespalten.

Wie weit in einer 3‰ Benzoesäurelösung die Benzoesäure dissoziiert ist, läßt sich leicht berechnen. 1 l 3‰ Benzoesäurelösung ist äquivalent mit 24,6 ccm Normalsäure und enthält also $\frac{24{,}6}{1000}$ Grammol. $= \frac{1}{40}$ Grammol. Benzoesäure.

Wenn man also in 40 l Wasser 1 Grammol. Benzoesäure löst, hat man eine Lösung der gleichen Konzentration.

$$K_{\text{Benzoesäure}} = 0{,}00006 = \frac{\alpha^2}{(1-\alpha)\,V} = \frac{\alpha^2}{40\,(1-\alpha)}$$

$$40 \times 0{,}0006 = \frac{\alpha^2}{1-\alpha}$$

$$\alpha = 0{,}048 = 4{,}8\%.$$

In einer 3‰ Benzoesäurelösung ist 4,8% der Benzoesäure also in Ionen gespalten.

Die desinfizierende Kraft der Benzoesäure wird zweifellos nicht bewirkt durch den Gehalt an freien Wasserstoffionen, sonst sollte Weinsäure stärker desinfizierend wirken als Benzoesäure.

Da die Benzoesäure am besten wirkt in Gegenwart einer andern stärkeren Säure (neben welcher sie dann fast vollkommen undissoziiert vorhanden ist), so wissen wir, daß die desinfizierende Kraft der Benzoesäure an das ungespaltene Molekül gebunden ist.

Zweifellos muß man die antiseptische Kraft der Benzoesäure größtenteils ihrer Lipoidlöslichkeit zuschreiben.

XI. Desinfektionsversuch mit Zimtsäure.

Auch Zimtsäure wird gegenwärtig zur Konservierung von Nahrungsmitteln häufig verwendet. Darum wurde zum Schluß noch der Einfluß von Zimtsäure auf das Wachstum der Bazillen untersucht.

Zimtsäure löst sich in destilliertem Wasser bei 15 bis 20° nur bis $\frac{1}{2}$‰, das ist also erheblich schlechter als Benzoesäure. Durch Zusatz von Säure (es wurden bis 10 ccm Normalschwefelsäure pro 10 ccm zugesetzt), ändert sich diese Löslichkeit praktisch nicht.

Ich stellte mir einen neutralen Agarnährboden her, dem ich respekt. $\frac{1}{4}$‰, $\frac{1}{2}$‰, $\frac{3}{4}$‰ und 1‰ Zimtsäure zusetzte.

Es hätte eigentlich schon genügt, wenn ich mit dem Zimtsäurezusatz nicht weiter gegangen wäre als bis auf $\frac{1}{2}$‰, weil es nicht sehr wahrscheinlich ist, daß Zimtsäure sich in Agar besser lösen würde als in Wasser. Da aber beim Abkühlen der Agar eher erstarrt, als die durch die Hitze gelöste Zimtsäure auskristallisiert, so wissen wir doch, daß diese ausgeschiedene Zimtsäure jedenfalls in äußerst fein verteiltem Zustande in dem Agar anwesend ist.

Der Agar wurde flüssig geimpft bei 40° C, dann in sterile Petrischalen ausgegossen.

Die Platten blieben 4 Tage im Brutschrank. Am Ende des vierten Tages waren die Resultate:

	0‰	¼‰	½‰	¾‰	1‰
Kartoffelbazillus . .	+	+	+	+	+
Heubazillus	+	+	+	+	+
Bodenbazillus . . .	+	+	+	+	+
Bac. mesent. . . .	+	+	+	+	+
Bac. subt.	+	+	+	+	+
Bac. mycoides . . .	+	+	+	+	+

Resultate: Auf einem Agarnährboden mit 1‰ Zimtsäure (wovon ½‰ gelöst und ½‰ in äußerst fein verteiltem Zustande im Nährboden anwesend), wachsen alle untersuchten Bazillen noch üppig. Auf einem Nährboden, der größtenteils aus Wasser besteht und eiweißartige Stoffe enthält, ist Zimtsäure kein brauchbares Konserviermittel.

Es ist sehr gut möglich, daß sich in Gegenwart von Weinsäure oder auf einem peptonarmen Nährboden etwas Ähnliches herausstellt als bei Benzoesäure, so daß mit andern Worten Zimtsäure sich unter diesen genannten Umständen vielleicht als ein sehr gutes Konservierungsmittel zeigt.

XII. Konservierung von Kleister mit Benzoesäure.

12 g Stärke wurden mit 10 ccm Wasser kalt verrührt und in 150 ccm siedendes Wasser eingetragen, dem kurz vorher 170 mg Benzoesäure, d. h. 1‰ zugesetzt war. Ebenso wurde 2 und 3‰ Benzoesäurekleister hergestellt. Dabei geht praktisch keine Benzoesäure verloren. Auffallend waren kleine Gasbläschen unter der Oberfläche des frisch hergestellten, Benzoesäure enthaltenden Kleisters, während die Proben ohne Benzoesäure keine Bläschen zeigten. Ob es sich um Kohlensäurespuren handelte? Schon 1‰ Benzoesäure gibt dem Kleister eine Spur eines aromatischen Geruchs. Die 3 Benzoesäurekleister und eine Kontrollprobe ohne Benzoesäure wurden frei im Zimmer aufgestellt.

Tag	Kleister + 0 ‰ Benzoesäure	Kleister + 1 ‰	2 ‰	3 ‰
3.	Auf der Oberfläche einige kleine Schimmelkolonien (grün).			
4.	Deutliche Schimmelentwicklung. Auch einige gelbfarbige, runde Fleckchen von 2 mm Diameter. Wo der Kleister den Rand des Becherglases berührt, ist der Kleister in einer 3 mm breiten Zone durchsichtig geworden. Zwischen dem Kleister und der Glaswand befindet sich eine wässerige Flüssigkeit. Sehen wir das Becherglas von der Seite an, dann finden wir die Farbe des Kleisters nicht mehr gleichmäßig, sondern marmorartig, weil durchsichtige glasige Stellen mit Stellen normaler bläulicher Farbe abwechseln. Der Kleister fängt also zu verflüssigen an. An der Oberfläche ist die Farbe nicht frisch bläulich weiß geblieben, sondern grauweiß, schmutzig, gelblich geworden. Kein übler Geruch.	Keine Änderung.	Keine Änderung.	Keine Änderung.
6.	An der Oberfläche sehr viel Schimmel (Penicillium), weiter 3 rote punktförmige Kolonien; 1 gelbbraune punktförmige Kolonie; 2 blaue Knötchen (4 mm Durchmesser). Alle Kolonien wurden auf Agar übergeimpft und wuchsen auf Agar. Stärkekleister sehr weich geworden.			
7.	Schimmel hat die Bakterienkolonien überwachsen. Farbe des Kleisters sehr schmutziggelblich. Muffiger Geruch, kein Gestank.			
8.	Zwischen Glaswand und Kleister Luftbläschen, also Gasbildung.			
9.	Starker muffiger Geruch. Starke Gasbildung, Verflüssigung, schmutzig-gelbgraue Verfärbung. Kein Gestank. Stellt man das Becherglas schräg, dann sieht man eine trübe, wässerige Flüssigkeit mit einigen festen Partikelchen darin.			

Tag	Kleister + 0 ‰ Benzoesäure	Kleister + 1 ‰	2 ‰	3 ‰
12.	Status quo.	Keine Änderung, nur ein bischen Eintrocknung, daher hat sich der Kleister oben von der Glaswand etwas zurückgezogen.	Außer Eintrocknung gar keine Änderung,	Außer Eintrocknung gar keine Änderung,
23.	Verflüssigung hat stark zugenommen. Kein Gestank.	Stark eingetrocknet 2 kleine Schimmelkolonien. Vielleicht ist durch Verdunstung von Benzoesäure das Schimmelwachstum möglich geworden. Weiter gar keine Änderung, also keine Verflüssigung oder Gasbildung oder Verfärbung. Schimmel hat sich nicht ausgebreitet.	Keine Änderung, nur Eintrocknen.	Keine Änderung, nur Eintrocknen.
36.	Keine wesentliche Veränderung. Kleister ganz zerstört.	Keine Veränderung.	Keine Änderung.	Keine Änderung.
63.		Keine Veränderung.	Keine Änderung.	Keine Änderung.

Resultat: Gewöhnlicher Kleister zeigte schon am dritten Tag einen Anfang des Verderbens, sich äußernd in Verfärbung, Verflüssigung, Erweichung, unangenehmem Geruch, Schimmel usw. Kleister mit 1‰ Benzoesäure zeigte nur eine gehemmte Schimmelbildung, die am 23. Tag anfing und am 63. Tag noch nicht weiter gekommen war als am 23. Tag. Kleister mit 2‰ und 3‰ Benzoesäure zeigten am 63. Tag noch keine Schimmelbildung oder andere Zeichen des Verderbens.

XIII. Konservierung von Appreturmasse mit Benzoesäure.

Die untersuchte Appreturmasse war eine graugelbe, schleimartige, gallertartige, zähe Masse mit Leimgeruch, aus einer Fabrik bezogen. Der Wassergehalt war 59,986% oder rund 60%, wie die Analyse zeigte; 40% der Appreturmasse war also feste Substanz. Diese feste Substanz besteht meistens aus Stärke; der Leimgeruch gab Veranlassung zur Vermutung auf Zusatz von Leim oder leimartigen Stoffen. Eine Kjeldahlanalyse gab 5 mg N per 1 g Appreturmasse, das ist 0,5% N oder $6{,}25 \cdot 0{,}5\% = 3{,}125\%$ Eiweiß resp. Leim. Es war wichtig, den Eiweißgehalt zu kennen, weil wir ja doch wissen, daß auf einem eiweißreichen Nährboden zur Hemmung des Wachstums von Bakterien und Schimmel mehr Benzoesäure erforderlich ist als auf einem eiweißarmen Nährboden. Nun stellten wir uns im Zimmer auf in Bechergläsern:

200 g Appreturmasse ohne Benzoesäure,
200 g „ mit 1‰ „
200 g „ mit 2‰ „

Benzoesäure enthaltende Appreturmasse wurde auf folgende Weise hergestellt: Appreturmasse auf Wasserbad erhitzt, wodurch sie flüssiger wird, dann die in einer Schale zerriebene Benzoesäure unter Umrühren zugesetzt. Das Umrühren wurde eine Viertelstunde fortgesetzt, damit sich alles löste.

Tag	Appreturmasse mit 0 ‰ Benzoesäure	mit 1 ‰ Benzoesäure	mit 2 ‰ Benzoesäure
4.	Einige Schimmelkulturen auf der Oberfläche.	Keine Änderung.	Keine Änderung.
5.	Schimmel hat sich über die ganze Oberfläche ausgebreitet.	Keine Änderung.	Keine Änderung.
9.	Schimmelhaut wird immer dicker. An der Oberfläche zwei wasserklare, tropfenförmige, verflüssigte Stellen, ein bischen erhaben. Weiter eine tropfengroße schüsselförmige Verflüssigung, deren Rand ein bischen erhaben ist. Die Masse riecht nach Schimmel, d. h. muffig und ein wenig sauer.	Keine Änderung.	Keine Änderung.
12.	Status quo. Bakterienkolonien von Schimmel überwachsen.	3 kleine Schimmelkolonien an der Oberfläche.	Keine Änderung.
30.	Noch immer kein Gestank.	Schimmel hat wenig zugenommen. Die drei Schimmelkolonien haben die Größe eines Pfennigs.	Keine Änderung.
60.	Schimmelhaut sehr dick (grün). Kein Gestank. Geruch muffig.	Status quo.	Keine Änderung.

Der Versuch mußte wegen Zeitmangel abgebrochen werden.

Resultat: Appreturmasse ist mit 2 ‰ Benzoesäure sehr gut zu konservieren (Versuchsdauer 2 Monate). Auf Appreturmasse mit 1 ‰ Benzoesäure ist das Schimmelwachstum schon sehr stark gehemmt. Die Appreturmassen mit 1 ‰ und 2 ‰ Benzoesäure waren am Ende des zweiten Monats sehr eingetrocknet (Oberfläche hohl).

Die Appreturmasse mit 0 ‰ Benzoesäure war bald verdorben und nicht so stark eingetrocknet. Wahrscheinlich wurde hier die Wasserverdunstung durch die Schimmelhaut zum Teil behindert.

XIV. Konservierung von Zitronensaft mit Benzoesäure.

Die verwendeten Zitronen wurden vor dem Auspressen geschält. Die Zitronenschale enthält ein ätherisches, antiseptisch wirkendes Öl, dessen antiseptische Wirkung die Benzoesäure stützen würde.

Der Saft wurde viermal durch Papier filtriert. Das Filtrat war eine gleichmäßige, gelbgrüne, sehr schwach trübe Flüssigkeit.

In vier Erlenmeierkölbchen a, b, c und d wurden je 25 ccm Saft abgefüllt. Jetzt brachte ich in b, c und d resp. 25 mg, 50 mg, 75 mg Benzoesäure (kristallisiert), d. h. resp. $1‰$, $2‰$ und $3‰$.

Ohne Erwärmung löste sich die Benzoesäure nicht, daher wurden die Kölbchen ein bischen erhitzt. Um keinen Fehler zu machen, wurde das Kölbchen mit Saft ohne Benzoesäure in derselben Weise erwärmt. Die Kölbchen wurden ohne Stöpsel im Zimmer aufgestellt. 24 Stunden später fand ich auf dem Boden aller Kölbchen ein Präzipitat. Das Präzipitat sah in allen Kölbchen gleich aus und hatte eine gelbgrüngraue Farbe. Der Bodensatz bestand nicht aus Benzoesäure, denn ich sah nicht die typischen Nadelkristalle, überdies befand sich das gleiche Präzipitat in dem Kölbchen ohne Benzoesäure. Wahrscheinlich bestand der Bodensatz aus sehr kleinen Partikelchen, die beim Filtrieren immer wieder durch den Filter hindurchgegangen waren und sich auf dem Boden der Kölbchen gesammelt hatten. Mikroskopisch stellte sich der Bodensatz als eine nicht organisierte amorphe Masse heraus. Es ist noch möglich, daß es eiweißartige Stoffe waren, die aus ihrer kolloidalen Lösung gefällt worden waren. Nach Schütteln verschwand der Bodensatz wieder, um sich nach einigen Stunden aufs neue zu bilden. Der Saft über dem Präzipitat war noch immer gelbgrün. Mehr als $3‰$ Benzoesäure löste sich nicht in dem Saft.

Beim Anfang des Versuches war die Azidität pro ccm Saft:

In Kölbchen a = 13,2 ccm $^1/_{10}$ Normalsäure
„ „ b = 13,3 „ „ „ (theoret. 13,28)
„ „ c = 13,35 „ „ „ (theoret. 13,36)
„ „ d = 13,45 „ „ „ (theoret. 13,44)

Tag	Zitronensaft + 0 ‰ Benzoesäure	1 ‰ Benzoesäure	2 ‰ Benzoesäure	3 ‰ Benzoesäure
5.	Einige Fäden im Saft. Ein Strich auf einer Agarplatte (sauern) zeigt nach 3 Tagen Schimmel.	Eine Öse vom Boden und eine Öse von der Oberfläche auf saurer Agarplatte ausgestrichen. Nach einer Woche noch gar kein Wachstum.	Impfstrich auf Agarplatte negativ.	Impfstrich auf Agarplatte bleibt negativ.
6.	Fäden haben sich vermehrt. Zitronensaftgeruch verschwunden. Geruch muffig.	Status quo.	Status quo.	Status quo.
7.	Auf dem Boden sehr viel Fäden und Knäuel. Ein Präparat zeigt Penicillium und viele Sporen. Kein Häutchen.	Status quo. Mikroskop. wurde weder im Bodensatz noch im Saft etwas gefunden.	Status quo. Mikroskop. nichts gefunden.	Status quo. Mikroskop. nichts gefunden.
10.	Schimmelkolonien an der Oberfläche.	Status quo.	Status quo.	Status quo.
14.	Schimmel hat sich auf dem Boden sehr vermehrt. Titer von 1 ccm Saft 13,3 ccm N.-Säure. Ein Schimmelhäutchen auf der Oberfläche. Der Saft hat seine gelbgrüne Farbe verloren und ist klarer als frischer Saft, d. h. die kolloidale Trübung ist verschwunden.	Titer 13,4 ccm $^1/_{10}$ N.-S. Mikroskop. Präparat negativ. Impfstrich auf sauerm Agar nach 7 Tagen noch negativ.	Titer 13,3 ccm N.-S. Präparat und Impfstrich negativ.	Titer 13,4 ccm N.-S. Präparat und Impfstrich negativ.

Tag	Zitronensaft + 0‰ Benzoesäure	1‰ Benzoesäure	2‰ Benzoesäure	3‰ Benzoesäure
28.	Titer von 1 ccm Saft 10,3 ccm $^1/_{10}$ N.-Säure. Schimmel hat sich stark vermehrt.	Titer 15,1 ccm $^1/_{10}$ N.-S. Mikroskop. Präparat und Impfstrich negativ. Makroskop. noch gar keine Änderung.	Titer 15,3 ccm $^1/_{10}$ N.-S. Übrigens wie hierneben.	Titer 15,2 ccm N.-S. Übrigens wie hierneben.
32.	Titer nicht mehr bestimmt.	Titer 15,8 ccm $^1/_{10}$ N.-S. Status quo.	Titer 15,3 ccm N.-S. Status quo.	Titer 15,3 ccm N.-S. Status quo.
56.	Status quo.	Präparat und Impfung wieder negativ.	Wie hierneben.	Wie hierneben.
70.	Der Schimmel füllt fast das ganze Kölbchen.	Titer von 1 ccm Saft, 19,6 ccm $^1/_{10}$ N.-S. Mikroskop. Präparat und Impfstrich negativ. Geruch und Geschmack nicht geändert.	Titer 17,88 ccm $^1/_{10}$ N.-Säure. Übrigens wie hierneben.	Titer 17,2 ccm $^1/_{10}$ N.-Säure. Übrigens wie hierneben.

Die Zunahme der Azidität des Saftes mit 1‰, 2‰ und 3‰ erklärt sich durch Wasserverdunstung; die Abnahme der Azidität des Saftes ohne Benzoesäure durch Konsum von Zitronensäure durch den Schimmel.

Resultat: Zitronensaft ohne Benzoesäure zeigte am 5. Tag Schimmel.

Aus Zitronensaft mit 1‰ Benzoesäure konnten nach 10 Wochen weder Bakterien noch Schimmel gezüchtet werden. Geruch und Geschmack waren gar nicht geändert, auch der Titer war nicht zurückgegangen. Nur die schwach gelbgrüne Farbe des frischen Saftes war in eine hellgelbe umgewandelt.

Derselbe Versuch wurde nun wiederholt, aber jetzt wurde der Zitronensaft nach Schütteln mit Talcum Venetum durch Papier filtriert. Filtrat war eine ziemlich klare Flüssigkeit mit einer weißlichen Trübung. Der nach diesem Verfahren erhaltene Saft war viel klarer als der Saft in dem ersten Versuch. In der Industrie wird der Zitronensaft immer mit Talcum Venetum geklärt.

In Kölbchen stellte ich mir nun Zitronensaft her mit resp. 0‰, 1‰ und 2‰ Benzoesäure. Die Kölbchen wurden wieder ohne Stöpsel im Zimmer aufgestellt.

Die Aziditäten dieser Säfte waren:

1 ccm	Zitronensaft	ohne Benzoesäure	11,5 ccm	$^1/_{10}$	Normalsäure
1 ccm	„	mit 1‰ „	11,6 ccm	„	„
1 ccm	„	mit 2‰ „	11,7 ccm	„	„

Nach 24 Stunden hatte sich kein Bodensatz gebildet wie im vorigen Versuch, nur fanden wir auf dem Boden Spuren von Talcum.

Tag	Zitronensaft ohne Benzoesäure	+ 1‰ Benzoesäure	+ 2‰ Benzoesäure
3.	Saft stark trüb; dicker, weißer Bodensatz. Zitronensaftgeruch ist verschwunden. Gärungsgeruch. Ein mikroskopisches Präparat zeigt Saccharomyces (viel Ähnlichkeit mit Saccharomyces ellipsoideus). Auf Agar übergeimpft.	Keine Änderung.	Keine Änderung.

Tag	Zitronensaft ohne Benzoesäure	+ 1 ‰ Benzoesäure	+ 2 ‰ Benzoesäure
6.	Bodensatz und Trübung stärker geworden. Der Saft hat sich nicht verfärbt.	Kein Bodensatz. Keine Trübung. Keine Geschmack- oder Geruchsänderung.	Wie hierneben.
34.	Titer 11,5 ccm $^1/_{10}$ Normalsäure pro ccm Saft.	Titer 12,0 ccm $^1/_{10}$ N.-S. Kein Bodensatz. Keine Geschmackänderung. Starke Gelbfärbung.	Titer 12,2 ccm $^1/_{10}$ N.-S. Wie hierneben.

Resultat: Auch hier war also Zitronensaft sehr gut mit 1‰ Benzoesäure zu konservieren. Der Titer des Saftes ohne Benzoesäure war am 34. Tag noch der gleiche als im Anfang des Versuches.

Während hier Zitronensäure verbraucht worden war, war die Konzentration durch Verdunstung doch die gleiche geblieben.

* * *

Die vorliegende Arbeit ist unter Verwendung eines Reisestipendiums aus dem Stokvis Fonds im Hygienischen Institut der Universität Würzburg ausgeführt. Mein verehrter Lehrer Herr Professor Dr. R. H. Saltet, Vorstand des Hygienischen Instituts Amsterdam, hatte mir empfohlen, mich in Würzburg womöglich mit einer Studie über Benzoesäure zu beschäftigen und speziell den Einfluß derselben auf die Sporenkeimung zu studieren. Ich fand in Würzburg bei Herrn Professor Dr. K. B. Lehmann eine sehr freundliche Aufnahme, ein bereitwilliges Eingehen auf meine Wünsche und vielfache Anregung und Förderung bei der Ausarbeitung des Themas. Nachdem die Arbeit in Würzburg im wesentlichen abgeschlossen war, habe ich im Hygienischen Institut in Amsterdam noch einige Ergänzungsversuche gemacht.

Ich gestatte mir, sowohl Herrn Professor Dr. Saltet als Herrn Professor Lehmann für alle Förderung und Hilfe meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Zusammenfassung der Resultate.

1. Der zur Hemmung des Wachstums benötigte Gehalt an Benzoesäure ist für alle sechs untersuchten Bazillenstämme der gleiche. (Bac. mesent., mycoid., subtilis, »Bac. aus Boden«, »Bac. aus Heu« und »Bac. von Kartoffeln«.)

2. Es macht keinen Unterschied, ob man frisch gezüchtete oder lang im Laboratorium kultivierte Stämme verwendet.

3. Bazillen und Sporen werden immer bei den gleichen Konzentrationen der Benzoesäure in der Entwicklung gehemmt. Es besteht also keine besondere Empfindlichkeit der Sporen gegenüber den Bazillen gegen Benzoesäure, und es geht nicht an, etwa durch Zusatz sehr kleiner Benzoesäuremengen zu Konserven die Keimung der Sporen in spezifischer Weise verhindern zu wollen.

4. Diese störende Dose beträgt für den üblichen streng neutralisierten Fleischextraktpeptonagar 3 ‰.

5. Nur ein kleiner Teil dieser Benzoesäure übt die desinfizierende Wirkung aus, der größte Teil wird durch die Eiweißsubstanzen der Nährböden, die leicht Säure festlegen, zu unwirksamen Stoffen gebunden. Dieser große Teil (etwa $^4/_5$) der Benzoesäuremenge läßt sich darum ganz glatt teilweise oder ganz durch die gleiche Menge anderer Säuren, die selbst nicht spezifisch desinfizierend wirksam zu sein brauchen, aber stärker sind als Benzoesäure, z. B. Weinsäure oder Schwefelsäure, ersetzen.

6. Mit steigendem Weinsäure- oder Schwefelgehalt nimmt daher die Menge der notwendigen Benzoesäure stark ab. Zahlenreihen im Text.

7. Benzoesäure eignet sich schlecht zur Konservierung von eiweißhaltigen, neutral reagierenden Substanzen.

8. Benzoesäure eignet sich ausgezeichnet zur Konservierung von eiweißarmen, sauer reagierenden Substanzen.

9. Benzoesäure dankt ihre desinfizierende Kraft ihrer Lipoidlöslichkeit; sie wirkt desinfizierend als ungespaltenes Molekül.

10. Benzoesäure verringert die Toxinbildung von Bac. botulinus, je mehr Benzoesäure sich im Nährboden befindet, desto

weniger Gift wird gebildet. Daß eine Benzoesäurekonzentration existiert, bei welcher die Toxinbildung vollkommen aufhört, die Bazillen sich aber noch vermehren, ist möglich, doch wird sie jedenfalls so dicht bei der Benzoesäurekonzentration liegen, bei welcher das Bazillenwachstum gehemmt ist, daß es praktisch ganz ohne Bedeutung ist.

11. Stärkekleister mit 2‰ Benzoesäure ist während wenigstens zweier Monate absolut haltbar.

12. Appreturmasse ist mit 2‰ Benzoesäure sehr gut zu konservieren (Versuchsdauer 2 Monate).

13. Zitronensaft läßt sich mit 1‰ Benzoesäure sehr schön konservieren (Versuchsdauer mehr als 2 Monate).

14. In neutralen Nährböden, die größtenteils aus Wasser bestehen und eiweißartige Stoffe enthalten, ist Zimtsäure kein brauchbares Konserviermittel. Über die Brauchbarkeit in sauren Lösungen sind keine Versuche von mir gemacht.

Literaturverzeichnis.

1. K. B. Lehmann und R. O. Neumann, Atlas und Grundriß der Bakteriologie und bakt. Diagnostik. 5. Aufl.
2. K. B. Lehmann, Die Hygienischen Untersuchungsmethoden. 2. Aufl.
3. L. Heim, Lehrbuch der Bakteriologie.
4. Ducland, Traité de Microbiologie.
5. R. H. Saltet, Gezondheidsleer.
6. Kolle und Hetsch, Die experimentelle Bakteriologie.
7. Kolle-Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen.
8. J. Belser, Studien über verdorbene Gemüsekonserven (Archiv für Hygiene Bd. LIV, S. 107—148).
9. R. Aderhold, Über die Verderber von Gemüsekonserven (Zentralbl. f. Bakt. II. Abt., Bd. V, S. 17).
10. v. Wahl, Über Verderber von Gemüsekonserven (Zentralbl. f. Bakt. II. Abt., Bd. 16, S. 489).
11. K. B. Lehmann, Die neuesten Arbeiten über Bestimmung, Konservierungskraft und Zulässigkeit der Benzoesäure (1908—1911). (Chemiker-Zeitung 1911, Nr. 140, S. 1297.)
12. A. Hatzfeld, Beitrag zur desinfizierenden Wirkung der Benzoesäure und Salizylsäure. 1908. Inaugural-Dissertation, Würzburg.
13. F. Warr, Beitrag zur Desinfektionswirkung organischer Säuren. Inaugural-Dissertation, Heidelberg.
14. Gerlach, Physiologische Wirkungen der Benzoesäure und des benzoesauren Natrons. (Verlag von H. Staadt, Wiesbaden 1909.)
15. Rosenblatt und Rozenband, Über den paralysierenden Einfluß gewisser Säuren (Benzoesäure und Salizylsäure) auf die alkoholische Gärung. Chem. Zentralbl. 1909, II, S. 1363.
16. Lührig und Sartori, Gärungshemmungen zuckerhaltiger Lösungen durch Konservierungsmittel. Chem.-Ztg. Repert 1908, S. 671.
17. W. Frei, Versuche über Kombination von Desinfektionsmitteln. Zeitschrift f. Hygiene und Infektionskrankheiten Bd. 75, S. 433.
18. Dr. Christian, Die biologische Wirkung der Desinfektion durch vereinigte Wirkung gesättigter Wasserdämpfe und flüchtige Desinfektionsmittel bei künstlich erniedrigtem Luftdruck.
19. Sendtner, Über Zitronensäfte des Handels. 1902.
20. Spaeth, Über Untersuchung und Zusammensetzung von Zitronensäften. 1902.

21. Beythien, Über Zitronensaft. Zeitschr. f. Untersuch. der Nahrungs- und Genußmittel 1906, Bd. 11, S. 101.
22. Fischer, Über eine Massenerkrankung an Botulismus infolge Genusses verdorbener Bohnenkonserven. 1907.
23. E. Pfuhl, Die Züchtung der anaeroben Bakterien in Leberbouillon sowie in Zuckerbouillon und in gewöhnlicher Bouillon. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt., Bd. 44, 1907, S. 378.
24. R. H. Saltet en Zeehandelaar, Werking van formaline en salicylzuur op de vorming van Botulinustoxine. Pharmaceut. Weekblad 1911, bl. 1337.
25. Lafar, Handbuch der Technischen Mykologie Bd. IV.

Lebenslauf.

Ich, Dirk Held, Holländer, bin geboren am 15. August 1888 zu Amsterdam in Holland als Sohn eines Fabrikanten und wohne zurzeit in Amsterdam.

Nach Besuch der „Openbare Lagere School" absolvierte ich die „Hoogere Burgerschool m. 5 j. c.", wo ich mir am 17. Juli 1907 das Reifezeugnis erwarb.

Hierauf besuchte ich die Universität Amsterdam 12 Semester.

Während zwei dieser Semester (1910—1911) war ich Assistent des Herrn Professor Dr. L. Bolk in der Anatomie.

Am Ende des 12. Semesters bekam ich auf Empfehlung der medizinischen Fakultät Amsterdam ein Reisestipendium aus dem Professor Stokvis Fonds.

Hierauf besuchte ich die Universität Würzburg 2 Semester.

Die ärztliche Prüfung habe ich an der Universität Amsterdam am 28. Mai 1914 abgelegt; das Doktorexamen am 1. August 1914 zu Würzburg. Am 13. Juni 1914 wurde ich zum Sanitätsoffizier bei der Armee in N.-Ost-Indien ernannt.

Vorstehende Dissertation habe ich unter Leitung des Herrn Professor Dr. K. B. Lehmann verfaßt.

Amsterdam, den 1. August 1914.

D. Held.